MECANISMES DE POLYPLOIDISATION MEGACARYOCYTAIRE DANS DES LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES.

INTRODUCTION

Parmi les affections malignes de la moelle osseuse, les syndromes myéloprolifératifs (maladie de Vaquez, leucémie myéloïde chronique, thrombocytémie essentielle et splénomégalie myéloïde), résultent d'une transformation maligne de la cellule souche hématopoïétique et ont en commun une prolifération accrue sans blocage de maturation des trois lignées myéloïdes, une hyperuricémie, une splénomégalie, une évolution terminale fréquente en myélofibrose et en leucémie aiguë.

Le caractère monoclonal de la prolifération cellulaire affectant les trois lignées médullaires a été clairement établi par l'étude des femmes noires hétérozygotes pour les isoenzymes de la G-6-P-D dans la maladie de Vaquez, la leucémie myéloïde chronique (LMC), la thrombocytémie essentielle (TE), et la splénomégalie myéloïde (populations érythrocytaire, granulocytaire, plaquettaire, toutes porteuses de la même unique isoenzyme).

Dans les syndromes myéloprolifératifs, la lignée plaquettaire est souvent affectée soit par les anomalies des fonctions plaquettaires soit par le nombre excessif des plaquettes. Cependant, il existe une hétérogénéité au sein des différents syndromes. En effet, alors que dans la leucémie myéloïde chronique, le volume mégacaryocytaire est petit ou normal, dans la thrombocytémie essentielle, la caractéristique médullaire est une augmentation de la ploïdie mégacaryocytaire.

Sur base de l'étude morphométrique des mégacaryocytes de souris, Harker a montré en 1968 une corrélation inverse entre le volume mégacaryocytaire moyen et la concentration plaquettaire (1,2). Après induction d'une thrombopénie, le volume mégacaryocytaire moyen augmente. Par contre, suite à l'hypertransfusion de plaquettes, la taille des mégacaryocytes diminue. Cette régulation est réalisée par une substance humorale appelée "thrombopoïétine" dont la nature reste à découvrir. Plusieurs cytokines ont une action thrombopoïétique (IL-6, IL-11, LIF ...). Par ailleurs, l'oncogène mpl issu d'un virus responsable chez la souris d'un syndrome myéloprolifératif avec fibrose médullaire code pour une protéine présentant des ressemblances avec certains membres de la famille des récepteurs de croissance hématopoïétiques. L'homologue humain de cet oncogène a été cloné (3). Les lignées mégacaryocytaires connues expriment intensément cet oncogène suggérant qu'il code pour un récepteur à un facteur très spécifique de la mégacaryocytopoïèse (4). Chez l'homme une corrélation similaire a été observée en condition normale. En pathologie, cette corrélation entre le volume mégacaryocytaire moyen et la concentration plaquettaire se vérifie d'une façon assez surprenante dans la leucémie myéloïde chronique alors que dans la thrombocytémie essentielle le volume mégacaryocytaire moyen élevé semble échapper au contrôle thrombopoïétique. Ces données ont été confirmées en cytofluorométrie en flux par Tomer (5) ainsi que par notre équipe.

Il est impossible d'obtenir une lignée continue à partir de cellules normales. La leucémie myéloïde chronique est particulièrement intéressante puisqu'elle présente des troubles de prolifération couplée à une régulation normale mégacaryocytaire. Nous avons établi dans notre laboratoire quatre lignées nouvelles issues de deux patients atteints de leucémie myéloïde chronique (lignées DB et DL) et de deux patients atteints de thrombocytémie essentielle (lignées AA et DD). L'étude morphométrique des mégacaryocytes de ces patients est en accord avec la théorie de Harker. Ces lignées sont établies et repiquées depuis plusieurs mois dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal.

2023251788

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/xflm0000

Par l'étude de ces lignées cellulaires issues de deux affections malignes prolifératives ou le phénomène de polyploïdisation est normal (LMC) ou anormal (TE), nous proposons d'étudier les anomalies du contrôle de l'endomitose mégacaryocytaire.

BUT DU TRAVAIL

Notre projet a pour but de déterminer les anomalies de la polyploïdisation entraînant l'hyperplaquettose de la TE à partir des lignées continues humaines que nous avons établies. La comparaison se fera avec nos lignées continues issues de patients atteints de LMC où le contrôle de la polyploïdisation mégacaryocytaire est normale. Nous avons montré que l'absence de polymérisation de l'actine induit la polyploïdisation des mégacaryocytes. Les esters de phorbol et certaines cytokines augmentent la ploïdie mégacaryocytaire, nous voulons démontrer que leur action sur ces lignées s'exerce sur le métabolisme de l'actine.

APPROCHE EXPERIMENTALE

1. **Développement de nouvelles lignées continues mégacaryocytaires**
Nous avons donc établi des lignées continues à partir de moelle de patients atteints de LMC et de thrombocytémie essentielle. D'autres affections malignes de la moelle osseuse s'accompagnent de perturbation de la mégacaryocytopoïèse (la maladie de Vaquez, la splénomégalie myéloïde, les myélodysplasies et certaines leucémies aigues à caractère mégacaryocytaire). Parallèlement à la caractérisation des lignées déjà établies, nous poursuivrons le développement d'autres lignées au fur et à mesure des opportunités de la clinique.

2. **Caractérisation des lignées établies**

a. **Cytologie**
Les quatres lignées seront analysées du point de vue cytologique par la coloration classique de May-Grünwald Giemsa (MGG). Ensuite, la présence de caractéristiques mégacaryocytaires telles que la présence de membranes de démarcation, des granules denses et granules α ainsi que le contenu en péroxydase plaquettaire seront étudiés par microscopie électronique.

b. **Cytochimie**
Les examens cytochimiques nous permettront de détecter en microscopie optique l'activité de la myélopéroxydase, des phosphatases acides, des estérases (alpha-naphtyl, alpha-naphtyl-butyrate, chloro-naphtyl-ASD acétate, estérases) ainsi que la positivité pour la réaction de PAS (Periodic Acid Schiff).

c. **Immunologie**
La mesure de ploïdie (coloration à l'iodure de propidium) est réalisée en cytofluorométrie en flux. Le contenu protéique pourra être simultanément quantifié par un immunomarquage direct à la fluorescéine. La cytofluorométrie en flux nous permettra de mesurer l'expression des protéines plaquettaires. C'est ainsi que notre étude portera sur la mise en évidence des glycoprotéines membranaires : la GPIIb/IIIa et la GPIb ainsi que sur les facteurs VIII et de von Willebrand. Par ailleurs, les contenus de granules alpha en PDGF, fibrinogène, facteurs de von Willebrand, β-TG et PF4 seront mesurés de même que le contenu des granules denses.

d. **Taille et distribution de ploïdie à l'étape basal**
Par morphométrie (Harker, 1968), nous pourrons estimer la taille des cellules et, par cytofluorométrie, la taille et la ploïdie des noyaux cellulaires.

e. **Caractéristique génétique**
Une analyse cytogénétique révèlera le caryotype de nos cellules ainsi nous confirmerons la nature maligne de nos cellules et l'absence d'anomalie supplémentaire. Les deux patients atteints de LMC et dont les lignées sont issues ont un réarrangement du bcr.

2023251789

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/xflm0000

3. **Caractérisation en culture et étude de la polyploïdisation**

a. **Taux de prolifération en culture**

Nous établirons le taux de prolifération en culture en calculant l'augmentation cellulaire en fonction du temps et en mesurant le taux d'incorporation de la thymidine tritiée.

b. **Culture sans sérum**

Mises en présence d'un milieu synthétique de base, beaucoup de cellules ne font que survivre. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fourni par le sérum. Cependant, le sérum a plusieurs inconvénients car il se présente sous forme de mixture très complexe dont les composants sont mal définis. C'est pourquoi, il s'avère intéressant de remplacer le sérum par un mélange connu de facteurs de croissance (milieu défini).

c. **Réponse aux cytokines**

Parmi les cytokines, l'IL-6, l'IL-11, le LIF, l'érythropoïétine et l'IL-3 ont la capacité d'augmenter la ploïdie des mégacaryocytes normaux. Nous étudierons la ploïdie des cellules de nos lignées suite à l'adjonction de ces facteurs. Une éventuelle synergie sera étudiée par l'addition de combinaison de ces facteurs.

Nous étudierons l'expression de l'homologue v-mpl dans les lignées que nous avons établies et sa modulation par les facteurs de croissance. Les oligonucléotides antisens seront utilisés pour définir le rôle de cette nouvelle molécule dans la lignée mégacaryocytaire (ploïdie en cytofluorométrie en flux). Cette technologie sera aussi appliquée à l'étude de la modulation de l'expression des gènes codant pour les récepteurs aux cytokines connus pour leur action stimulante de l'endomitose (IL-6R, LIF-R, IL-11-R...).

4. **Etude de l'actine**

Nos études chez la souris suggèrent que l'absence de polymérisation de l'actine entraîne l'endomitose mégacaryocytaire (6). Nous avons confirmé ces données chez l'homme par l'étude de lignées leucémiques à caractéristique mégacaryocytaire (DAMI, MEG01, HEL, K562). Nous avons remarqué après quatre jours de culture une augmentation de la taille et de la ploïdie de ces cellules suite à l'adjonction d'ester de phorbol (stimulant non spécifique des récepteurs aux facteurs de croissance) et/ou de cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation de l'actine). Ces expériences seront également réalisées sur nos propres lignées. Le rôle physiologique de l'actine dans l'induction de la polyploïdisation doit encore être démontré. Dans ce but, nous comptons mesurer l'actine sous ses différentes formes :

a. **Mesure globale au cytofluoromètre en flux.**

Nous avons mis au point la mesure globable de l'actine sur des populations lymphocytaires par marquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'actine. Les quantités globales d'actine seront mesurées sur les quatres lignées mégacaryocytaires à notre disposition avant et après stimulation au PMA et à la cytochalasine B. Une corrélation avec la ploïdie de ces cellules pourra être effectuée par marquage concomittant des cellules à l'iodure de propidium. Dans ce cas, trois possibilités peuvent être envisagées. Tout d'abord, une absence d'augmentation de l'actine permettrait de postuler que la plus grande partie de l'actine est impliquée. Ensuite, une augmentation "saltatoire" ou progressive suggèrerait qu'une faible partie seulement de l'actine serait impliquée dans l'endoréduplication.

b. **Mesure qualitative de l'actine G et de l'actine F**

L'actine se présente sous deux formes : l'actine G monomérique et soluble et l'actine F polymérisée et insoluble. L'actine G tout comme l'actine F ont la capacité de se lier à toute une série de ligand. La profiline se lie à l'actine G et gène la polymérisation.

La gelsoline rompt les filaments d'actine F et se lie à une des extrémités. Ces deux protéines rendent compte de la structure de la cellule. La tropomyosine se lie latéralement le long du filament et la myosine se déplace le long de celui-ci. Ce sont elles qui assurent la motilité de la cellule. Enfin, la villine et l'alpha-actinine connectent les filaments entre eux formant ainsi les trames ou réseaux.

La concentration d'actine est relativement constante dans toutes les cellules. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle a été utilisée comme contrôle de l'expression génique d'autres molécules. Quelques anticorps monoclonaux reconnaissent différents épitopes de l'actine. Malheureusement, ils ne permettent pas réellement de déceler les sites de liaison aux différents ligands et dès lors de mettre en évidence les différents types d'actine. C'est par

2023251290

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/xflm0000

marquage fluorescent que nous pourrons mettre en évidence dans l'endomitose le type d'actine et donc la fonction perturbée (motilité, structure par exemple,...). De plus, la phalloïdine qui se lie spécifiquement au filament d'actine permettra d'analyser le processus dynamique de la formation d'actine. Dès lors de façon à mettre en évidence le type précis d'actine, nous emploierons le tri cellulaire au cytofluoromètre en flux (Coulter Elite) sur les lignées ainsi que sur les cellules normales. Cette technique a déjà été mise au point dans notre laboratoire. Nous avons déjà séparé des mégacaryocytes en diverses phases mitotiques (2N et > 2 N). Après tri de ces cellules en fonction des classes de ploïdie, nous pourrons par électrophorèse déterminer les modifications quantitatives et qualitatives de l'actine.

c. **Modification de l'expression du gène de l'actine**

L'expression du gène de l'actine est un phénomène modulable. Les agents adrénergiques et l'héparine conduisent à la synthèse d'actine (7,8,9,10). Nous testerons leurs effets sur l'induction de polyploïdisation de nos lignées cellulaires. Certains facteurs de transcription contrôlent la synthèse d'actine. Par addition d'oligonucléotides antisens au milieu de culture, nous bloquerons ces facteurs de transcription et étudierons leurs effets sur la ploïdie des cellules des lignées en culture.

REFERENCE

1. Harker LA: Megakaryocyte quantitation. J Clin Invest 47:452, 1968
2. Harker LA: Kinetics of thrombopoiesis. J Clin Invest 47:458, 1968
3. Vigon: PNAS 89:5640-5644, 1992
4. Wendling F.: Proceedings of the ASH. Blood 80, 1992(Abstract)
5. Tomer A, Harker LA, Burstein SA: Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. Blood 71:1244, 1988
6. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. Blood 80, 497a, 1992(Abstract)
7. Bishopric NH, Sato B, Webster KA: β-Adrenergic regulation of a myocardial actin gene via a cyclic AMP-independent pathway. J Biol Chem 267:20932, 1992
8. Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Grau G, Gabbiani G: Heparin induces α-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. Lab Invest 67:716, 1992
9. Bishopric NH, Jayasena V, Webster KA: Positive regulation of the skeletal α-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. J Biol Chem 267:25535, 1992
10. Muthuchamy M, Pajak L, Wieczorek DF: Induction of endogenous myosin light chain 1 and cardiac α-actin expression in L6E9 cells by MyoD1. J Biol Chem 267:18728, 1992

2023251791

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/xflm0000